

Artículo original

Métodos para determinar la biocompatibilidad en materiales dentales

Methods for determining the biocompatibility of dental materials

Valentina RÍOS¹, Natali ROMERO¹, Carlos VALENCIA², Julián BALANTA²

1. Estudiante de odontología, Universidad del Valle (Cali, Colombia). 2. Profesor Escuela de Odontología, Universidad del Valle (Cali, Colombia); Grupo de Investigación Biomateriales Dentales, Universidad del Valle (Cali, Colombia).

RESUMEN

Introducción: Los materiales de uso odontológico son sometidos a diferentes pruebas para determinar su compatibilidad, bioactividad, y demostrar que son aptos para permanecer en el medio oral sin producir una respuesta adversa. Con tal propósito actualmente en el mundo se emplean distintas técnicas como los cultivos celulares, técnicas de biología molecular hasta el empleo de larvas de camarón (brineshrimplarvae) mejor conocidas como Artemia salina.

Objetivo: Caracterizar cinco materiales odontológicos, utilizando la prueba de citotoxicidad con larvas de camarón Artemia salina.

Materiales y métodos: Se realizó prueba de citotoxicidad de unas muestras de Titanio IV, Silicona Pesada, Acrílico de Auto-curado, Resina de foto-curado y Eugenolato, utilizando el método de Artemia salina.

Resultados: El ensayo de citotoxicidad con Artemia salina mostró que para la viabilidad de las larvas el eugenolato es 100 % toxico ya que eliminó todas las larvas, y los otros productos mostraron biocompatibilidad en los siguientes porcentajes: titanio tipo IV 100%, silicona 46%, acrílico 62% y

resina 72%.

Conclusión: El método de la Artemia salina es sencillo y económico para realizar estudios de citotoxicidad, no requiere mayor tecnología en infraestructura, y combinado con otras técnicas de biología celular puede convertirse en un método tan específico como se desee. El titanio tipo IV mostró 0% y el eugenolato 100% de citotoxicidad para viabilidad de las larvas de Artemia Salina.

Palabras clave: Materiales dentales, biomaterial, biocompatibilidad, test de citotoxicidad, Artemia salina.

SUMMARY

Background: The dental materials are subjected to various tests for consistency, bioactivity, and demonstrate that they can remain in the oral environment without producing an adverse response. Currently for this purpose worldwide are employed different techniques such as cell culture, techniques of molecular biology and the use of shrimp larvae (brineshrimplarvae) better known as Artemia salina.

Objective: Characterize five dental materials using a cytotoxicity test with larval shrimp Artemia salina.

Materials and methods: A cytotoxicity study was performed on samples of Titanium Type IV, Silicone Heavy, Auto-cured acrylic resin and photo-curing and Eugenolat using the method of Artemia salina.

Results: The cytotoxicity assay for Artemia Salina showed no viability for eugenolato because all the larvae were eliminated, and

other products showed biocompatibility in the following percentages. Titanium type IV 100%, the silicone 46%, acrylic 62% and resin 72%.

Conclusions: The method of brine shrimp is a simple and economical method for studies of cytotoxicity, requires greater infrastructure technology, and combined with other techniques of cell biology can become as specific method as desired. There is viability for the artemiasalina larvae with type IV titanium of 100% and with eugenolato of 0%

Key words: Dental materials, biomaterial, biocompatibility, cytotoxicity assay, Artemia salina.

INTRODUCCIÓN

Todos los materiales dentales utilizados en la consulta odontológica, según su aplicación estará en contacto con tejido óseo, gingival, muscular, mucoso y pulpar, además con fluidos como, sangre y saliva. Como sustitutos artificiales que interaccionan con el organismo, los materiales odontológicos deben ser sometidos a diferentes pruebas para determinar su biocompatibilidad.

En las conferencias de Chester (1) 1986 y 1991 no hay una definición clara del concepto biocompatibilidad, debido a que esta no es una propiedad inherente o intrínseca de un material, es claro que un material es biocompatible o no dependiendo del entorno biológico; en este sentido se podría definir la biocompatibilidad como

Recibido para publicación: Junio 09 de 2014
Aceptado para publicación: Octubre 17 de 2014
Correspondencia:
C. Valencia, Universidad del Valle
carvalenc@gmail.com

la aceptabilidad biológica y el estudio de la interacción de los biomateriales con los tejidos susceptibles de estar en contacto con ellos.

La evaluación de la biocompatibilidad in vivo con modelos animales es un paso previo y obligatorio que debe ser realizado antes de ensayar un producto en seres humanos según la Declaración de Helsinki 1964 (2), las Normas CIOMS OMS-2002 (3), y La Resolución 8430 1994 del Ministerio de Salud de Colombia.

Desde la década de 1980 ha tomado fuerza la tendencia a realizar cada vez más estudios de citotoxicidad in vitro para dar cumplimiento a las recomendaciones de las tres R de Russell (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) (4), y también debido a los avances que se han tenido en el campo de la biología celular con los desarrollos en técnicas de cultivos y en nuevos métodos de caracterización.

La norma ISO 10993 o su equivalente europea UNE-EN ISO 10993 (evaluación biológica de productos sanitarios), describe los diferentes tipos de prueba a realizar, biomodelos animales, sitios de implantación, diseño de preparaciones, diseño de muestras a implantar, etc. Esta misma norma recomienda, siempre que en lo posible se deben realizar pruebas preliminares en modelos celulares. Como tipo celular pueden utilizarse fibroblastos, linfocitos, osteoblastos, etc., las líneas de células inmortales (continuas) son muy populares por su larga duración y disponibilidad, pero presentan el problema del costo, y que pueden ser menos sensibles a sustancias tóxicas que las células normales (finitas) (4), por esta razón también se utilizan las células provenientes de cultivos primarios adecuadamente obtenidos y caracterizados.

En el área odontológica se emplean numerosos materiales, los cuales dependiendo de su aplicación estarán en contacto con diversos tejidos como mucosa, tejido gingival, tejido pulpar, tejido dental duro, tejido óseo, etc. Pero todos tienen en común que van a

estar en contacto de una u otra forma con células vivas, de esta forma son similares los test empleados para operatoria y estética (5-16), endodoncia (17-21), periodoncia y cirugía oral (22-28), ortodoncia (29), o rehabilitación (30-35). En la mayoría de los trabajos revisados utilizan poblaciones celulares para evaluar la citotoxicidad, sin embargo en el estudio in vitro de los biomateriales dentales también se han utilizado organismos completos como las larvas de camarón *brineshrimplarvae*, mejor conocidas como *Artemia salina* (36,37).

La *artemia* adulta es utilizada como fuente de alimento para acuarios, y su utilización en el laboratorio se debe a la sensibilidad de la larva ante la citotoxicidad. El camarón de agua salada *Artemia* pertenece al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda; y están estrechamente relacionados al zooplancton (38).

El ciclo de la *artemia* se inicia por la eclosión (brote) de los quistes latentes, embriones encapsulados que son metabólicamente inactivos. Los quistes pueden permanecer latentes durante muchos años, siempre y cuando se mantengan secos. Cuando los quistes se colocan de nuevo en el agua salada, a la temperatura adecuada, son rehidratados y pueden reanudar su desarrollo. A la sensibilidad de las larvas se le debe su amplio uso en laboratorios de pruebas toxicológicas, y su amplia y variada aplicación ya que se ha utilizado por más de 50 años como referencia de prueba citotóxica (39-43).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la caracterización de biocompatibilidad a cinco materiales de aplicaciones odontológicas, utilizando una prueba de citotoxicidad con larvas de camarón *Artemia salina*. Ensayo que fue realizado en el laboratorio de cultivos celulares in vitro de la Universidad del Valle, y en el marco de una investigación que contaba con aval del comité de ética de la Universidad del Valle; según el protocolo referenciado por Sánchez y Neira (44):

1. Se preparó una solución de agua salada (1000 ml/3 gms sal marina).
2. Se pesaron 2,5 gramos de huevos de *Artemia salina* (Figura 1).
3. Se hidrataron los huevos en 1 litro de la solución preparada, en presencia de luz artificial, oxigenación y a temperatura ambiente durante 48 h (Figura 1).
4. Se revisaron si los huevos hicieron eclosión (Figura 1), mediante un microscopio óptico corriente.
5. Se sembraron 10 individuos (larvas en etapa Nauplius) por pozo en una caja de 25 pozos.
6. En 5 pozos se depositó el material a evaluar (discos titanio IV, silicona pesada, acrílico de auto-curado, resina de foto-curado y eugenolato) (Figura 2), en contacto con las larvas y el medio salino.
7. En 5 pozos se depositaron las larvas solo en contacto con el medio salino.
8. No se usó control negativo
9. Se incubaron a temperatura ambiente por 24 h, se realizó un monitoreo cada 4, 6, 8, 12 y 24 h.
10. Al cabo de las 24 horas se contabilizaron los organismos vivos y por diferencia se determinó el porcentaje de mortalidad.

RESULTADOS

Los materiales a evaluar titanio IV, silicona pesada, acrílico de auto-curado, resina de foto-curado y eugenolato, presentaron diferentes grados de citotoxicidad a observar (Tabla 1). Se midió el pH del medio de cada uno de los pozos, con el producto y la *Artemia salina*; se determinó el pH de la siguiente manera silicona 12.2, acrílico 7.8, eugenolato 12.7 y resina 2.8 (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Es necesario asegurar que los materiales que van a estar en contacto con tejido vivo, tanto como aplicaciones odontológicas o de cualquier otro tipo sean probadas adecuadamente para garantizar su biocompatibilidad. La literatura científica especializada muestra numerosos métodos

que evalúan diversos aspectos según el nivel de complejidad, de esta forma en el campo de los biomateriales odontológicos podemos encontrar desde las pruebas que evalúan la citotoxicidad de materiales dentales con base a la integridad celular utilizando métodos colorimétricos como: Eltest por azul tripan (5,19,45); el ensayo de sulforhodamina-B (6,46), el test de la lactato deshidrogenasa (5), MTT (5) y el test del methyltetrazolium (8). La integridad celular se puede evaluar también por morfometría utilizando microscopia electrónica; o se puede estudiar la expresión de componentes especiales mediante Elisa, Western Blot, Citometría de flujo, etc. (5).

Un método que aparece reportado desde hace 40 años no utiliza células sino larvas de camarón puede dar una idea inicial de la citotoxicidad de un material, y combinado con otras técnicas de biología molecular puede llegar a ser tan específico como cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, se trata del Test de citotoxicidad con *Artemia salina* (36-44).

Normalmente, el Test de *Artemia* es utilizado como una vía inicial de tamizaje citotóxico in vivo de extractos, fracciones y compuestos depurados, lo que permite discriminar muestras de elevada toxicidad; además presenta buena correlación con la citotoxicidad in vitro (47).

El bioensayo de la *Artemia salina* fue realizado de acuerdo con protocolos ya estandarizados y disponibles en la literatura referenciada; de acuerdo con De Albuquerque *et al* (2014), es considerado tóxico el producto que induce la mortalidad mayor o igual a 30% (43).

Este estudio determinó que usando la prueba de *Artemia salina* como prueba preliminar de valoración de citotoxicidad, el eugenolato es 100 % tóxico y los otros productos mostraron citotoxicidad en los siguientes porcentajes. El titanio tipo IV 0%, la silicona 54%, el acrílico 38% (muestras previamente polimerizadas) y la resina 28%. Después de 48 h se encontraron todas

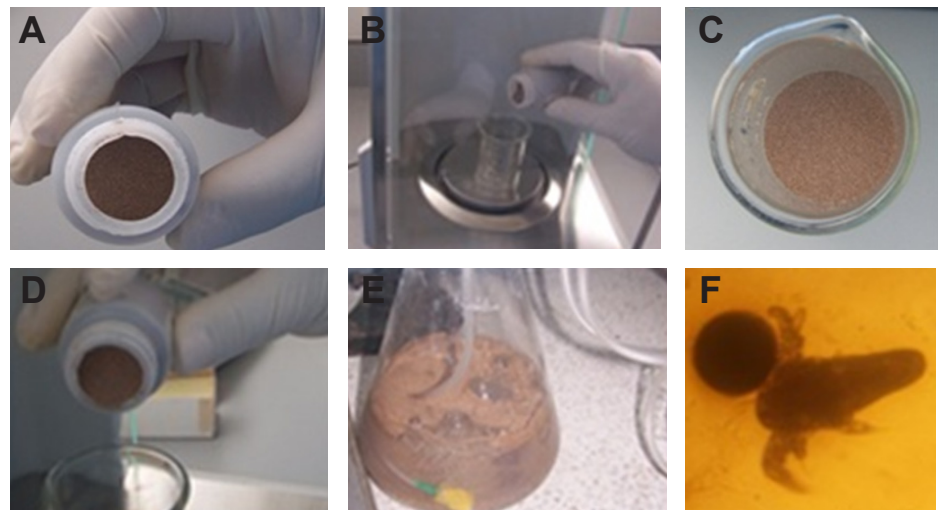


Figura 1. Determinación de la cantidad de huevos de *Artemia salina*. A. huevos de *Artemia salina*. B. Se pesaron 2,5 gramos de huevos de *Artemia salina*. C, D y E. Se hidrataron los huevos en 1 litro de la solución preparada, en presencia de luz artificial, oxigenación y a temperatura ambiente durante 48 h. F. Se observa la eclosión de las larvas con el microscopio.

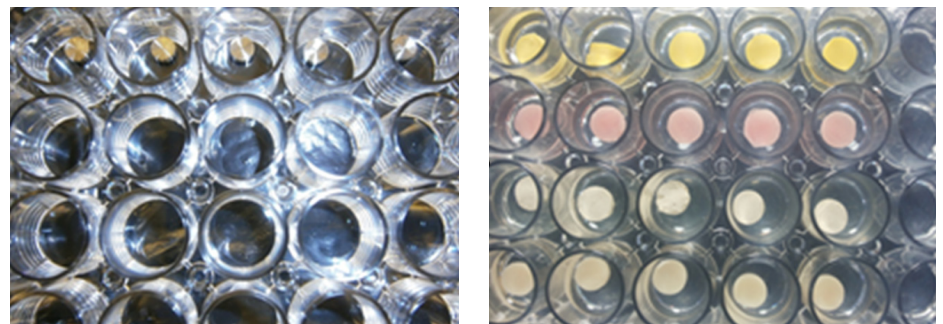


Figura 2. Pozos con los materiales de estudio.

las larvas muertas para todos los materiales lo cual es aceptado como normal en el test.

En reportes anteriores se ha demostrado que el eugenol puede llegar a provocar lesiones cáusticas o quemaduras superficiales cuando es colocado en forma directa y en altas concentraciones en los tejidos blandos. La severidad del daño es proporcional al tiempo de exposición, a la dosis y a la concentración. Se ha visto que el eugenol puede llegar a mostrar tanto in vivo como in vitro diferentes tipos de toxicidad, tales como daño directo al tejido, dermatitis, reacciones alérgicas, disfunciones hepáticas, coagulación intravascular diseminada,

hipoglicemia severa, e incluso la muerte por falla orgánica múltiple (48).

El eugenol puro en concentraciones mayores de 10-4 mol/L produce la inhibición de la migración celular y modifica la síntesis de las prostaglandinas, lo que afecta la respiración celular, la actividad mitocondrial y produce severos cambios en la actividad enzimática de la membrana celular (49). Este estudio mostró que la resina de fotocurado presenta un 28% de toxicidad para las larvas de *Artemia salina* lo cual se acerca al límite de 30 % planteado anteriormente como indicador de toxicidad 43, y contrasta con estudios in vitro de la actividad

citotóxica de resinas dentales tipo BIS-GMA (50-52) que indican que este material es tóxico, lo cual podría explicarse por la diferencia de blanco ya que en el caso de Rios *et al* (50) se utilizan fibroblastos lo que aumenta la sensibilidad al componente tóxico.

Varios grupos de investigación han utilizado el método de *Artemia salina* como prueba de viabilidad de distintos materiales, indirectamente tratando de estandarizar el empleo de este método como uno de los primeros pasos en las pruebas de biocompatibilidad.

En el estudio de Manar *et al* (37), cuatro materiales compuestos con diferentes composiciones se ensayaron junto con un ionómero convencional de auto-curado CIV (Ketac-Fil) y un ionómero modificado con resina de fotocurado CIV-RM (Vitremer) y dos compómeros y un compómero fluido. Donde los resultados del estudio apoyaron la hipótesis de que los extractos etanólicos de materiales compuestos y los CIV y compómeros son tóxicos para las larvas de camarón de salmuera (48).

Estos mismos materiales fueron estudiados previamente y el grado de efecto citotóxico fue diferente con el ensayo de toxicidad de MTT en ratones Balb/C3T3 fibroblastos. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que las dosis tóxicas para las larvas de camarón de salmuera se encuentran en el rango de 10-100 veces mayor en comparación con los métodos de cultivo de células (37).

Pelka *et al* (51) evaluaron la toxicidad de los residuos de composites y compómeros en *Artemia salina* considerado como un organismo sensible, concluyeron que la técnica era rápida y de bajo costo, pero que tenía baja sensibilidad.

Kedjaurne *et al* (52) compararon la liberación de Metil-metacrilato MMA y la cantidad de monómero residual liberado en saliva de tres acrílicos de termo y autocurado con diferentes métodos de procesamiento y/o diferentes proporciones durante la

Material	Titanio		Silicona		Acrílico		Resina		Eugenolato		Control	
Pozo	Vivas	%	Vivas	%	Vivas	%	Vivas	%	Vivas	%	Vivas	%
1	10	100	7	70	6	60	8	80	0	0	10	100
2	10	100	6	60	7	70	6	60	0	0	10	100
3	10	100	5	50	7	70	8	80	0	0	10	100
4	10	100	5	50	6	60	7	70	0	0	10	100
5	10	100	0	0	5	50	7	70	0	0	10	100
Total	50	100	23	46	31	62	36	72	0	0	10	100

Tipo de muestra	pH del medio (inicial)	pH a las 24 hrs (final)	Toxicidad a las 24 horas (%)	Larvas vivas a las 48 horas (%)
Titanio	7.8	7.8	0	0
Silicona	7.8	12.2	54	0
Acrílico	7.8	7.8	38	0
Eugenolato	7.8	12.7	100	0
Resina	7.8	2.8	28	0
Control (sin muestra)	7.8	7.8	0	0

mezcla utilizando un cultivo de fibroblastos humanos. Los resultados mostraron que la cantidad de residual monómero era no sólo depende del tipo de polimerización, sino también en la cantidad de líquido en la relación de mezcla y el método de procesamiento. El acrílico que tenía menor cantidad de monómero residual, también liberó la menor cantidad de MMA, sin embargo, los materiales que tenían mayor cantidad de monómero residual, no fueron los que liberaron la mayor cantidad de MMA, el cual resultó tóxico para el cultivo celular.

CONCLUSIONES

La prueba de toxicidad por *Artemia salina* es un método de aproximación preliminar válido para realizar tamizaje inicial de toxicidad, y puede ser implementado sin requerimientos especiales de infraestructura o equipo

Las pruebas realizadas a los diferentes materiales mostraron resultados que están

acorde con lo reportado en la literatura especializada

El titanio tipo IV mostró 0% y el eugenolato 100% de toxicidad para viabilidad de las larvas de *Artemia Salina*.

Al tener en cuenta que el pH inicial y final para el titanio (control bajo) y para el medio (control sin larvas) no cambió, podemos decir que las alteraciones en el pH en el caso de las demás muestras se deben a cambios químicos de los materiales, los cuales posiblemente influyeron en el aumento de la toxicidad y produjeron la muerte de los organismos.

La técnica de *Artemia Salina* está indicada para usar durante periodos de pocas horas, debido a su corto periodo de vida (48 horas).

REFERENCIAS

1. Gil F, Ginebra M, Planell J. Biomaterials.

- Descriptiva de materials: Materials en el procés de disseny [internet] 2002 [citado Octubre 10 de 2013] Disponible en: http://tdd.elisava.net/coleccion/20/gil_ginebra_planell)
- Declaración de Helsinki: principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos. Acta Bioética 2000 [citado Septiembre 13 de 2013] año VI, nº 2. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/105551355/DECLARACION-DE-HELSINKI>
 - CIOMS. Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. [citado Octubre 10 de 2013] Disponible en: http://www.cioms.ch/publications/guidelines/pautas_eticas_internacionalin.htm
 - Rach J, Halter B, Aufderheide M. Importance of material evaluation prior to the construction of devices for in vitro techniques. Exp Toxicol Pathol 2013; 65(7-8): 973-8.
 - Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. Crit Rev Oral Biol Med 2000; 11(3):333-55.
 - Koulaouzidou E, Papazisis K, Economides N, Beltes P, Kortsaris A. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three fibroblastic cell lines. JOE 2005; 31(1):44-6.
 - Mohamad N, Shaari R, Alam M, Rahman S. Cytotoxicity of silverfil argentums and dispersalloy on osteoblast cell line. International Medical Journal 2013; 20(3): 332-4.
 - Yalcin M, Ulker M, Ulker E, Sengun A. Evaluation of cytotoxicity of six different flowable composites with the methyl tetrazolium test method. Eur J Gen Dent 2013; 2:292-5.
 - Yih-Dean Jan, Bor-Shiunn Lee, Chun-Pin Lin, Wan-Yu Tseng. Biocompatibility and cytotoxicity of two novel low-shrinkage dental resin matrices. JFMA 2012; 113(6): 349-55.
 - Yalçin M, Barutçigil Ç, Umar I, Bozkurt B, Hakki S. Cytotoxicity of hemostatic agents on the human gingival fibroblast. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2013; 17 (7):984-8.
 - De Andrade A, Machad I, Zeppone E, Teresinha A, Pavarina C, Vergani. Cytotoxicity of monomers, plasticizer and degradation by-products released from dental hard chairside reline resins. Dent Mater 2010; 26(10):1017-23.
 - Aranha E, Giroa P, Souza J, Hebling C, de Souza C. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. Dent Mater 2006; 22(09):864-9.
 - Schweikla H *et al*. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. Biomaterials 2005; 26(14):1713-19.
 - Franz F, König T, Lucas, Watts DC, Schedle A. Cytotoxic effects of dental bonding substances as a function of degree of conversion. Dent Mater 2009; 25(2):232-9.
 - Porto D, Oliveira R, Raelle K, Ribas M, Montes C, De Castro. Cytotoxicity of current adhesive systems: In vitro testing on cell cultures of primary murine macrophages. Dent Mater 2011; 27(3):221-8.
 - Fernandes A, Marques M, Camargo S, Cardoso P, Camargo C, Valera M. Cytotoxicity of non-vital dental bleaching agents in human gingival fibroblasts. Braz Dent Sci 2013; 16(1):59-65.
 - Kangarloo A, Sattari M, Rabiee F, Dianat S. Evaluation of cytotoxicity of different root canal sealers and their effect on cytokine production. IranEndod J 2009; 4(1):31-4.
 - Soliman H, Anwar R. Effect of surgically implanted root-end filling materials on the structure of draining lymph nodes of male albino rats: histological and immunohistochemical study. E J Histology 2012; 35(4):736-48.
 - Bolla N, Nalli SM, Sujana, Kumar K, Ranganathan, Raj S. Cytotoxic evaluation of two chlorine-releasing irrigating solutions on cultured human periodontal ligament fibroblasts. J NTR Univ Health Sci 2013; 2:42-6.
 - Yoshino P, Nishiyama C, Modena K, Santos C, Sipert C. In Vitro Cytotoxicity of White MTA, MTA Fillapex® and Portland Cement on Human Periodontal Ligament Fibroblasts. Brazilian Dental Journal 2013; 24(2):111-6.
 - Pérez M, Querol E, Aranda R, Opsina G. Evaluación in vitro de la citotoxicidad de tres selladores endodóncicos sobre fibroblastos de ratón de la línea celular L929. Revista Odontológica Mexicana 2006; 10(2):63-8.
 - Wise J, Cabiling D, Yan D, Mirza N, Kirschner R. Submucosal injection of micronized acellular dermal matrix: analysis of biocompatibility and durability. PlasReconsSurg 2007; 120(5):1156-60.
 - Tetè S, Mastrangelo F, Quaresima R, *et al*. Influence of novel nano-titanium implant surface on human osteoblast behavior and growth. Implant Dent 2010; 19(6):520-31.
 - Odabaş M, Ertürk M, Çınar Ç, Tüzüner T, Tulunoğlu Ö. Cytotoxicity of a new hemostatic agent on human pulp fibroblasts in vitro. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2011; 16(4): 584-7.
 - Muglali M, Yılmaz N, Inal S, Guvenc T. Immunohistochemical comparison of indermil with traditional suture materials in dental surgery. Journal of Craniofacial Surgery 2011; 22(5):1875-9.
 - Kun H, Wei Z, Xuan L, Xiubin Y. Biocompatibility of a Novel Poly (butyl succinate) and Polylactic Acid Blend. ASAIJ Journal 2012; 58(3):262-7.
 - Tavares D, Castro L, Soares G, Alves G, Granjeiro J. Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted β -tricalcium phosphate. J Appl Oral Sci 2013; 21(1):37-42.
 - Barreno AC. Biocompatibility of n-butyl-cyanoacrylate compared to conventional skin sutures in skin wounds. Revista Odontológica Mexicana 2013; 17(2):81-9.
 - Angiero F, Farronato G, Dessy E, *et al*. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of orthodontic bonding adhesives upon human gingival papillae through immunohistochemical expression of p53, p63 and p16. IJAR 2009; 29(10):3983-7.
 - Sjögren G, Sletten G, Dahl J. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests. J prosthet dent 2000 84(2):229-36.
 - Kehe FX, Reichl J, Durner U, Walther R, Hickel W, Forth. Cytotoxicity of

- dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials* 2001; 22(4): 317-22.
32. König FF, Skolka A, Sperr W, Bauer P, Lucas T, Watts D, Schedle A. Cytotoxicity of resin composites as a function of interface area. *Dent Mater* 2007 23(11):1438-46.
 33. McGinley E, Moran G, Fleming G. Biocompatibility effects of indirect exposure of base-metal dental casting alloys to a humanderived three-dimensional oral mucosal model. *J dent* 2013; 41(11):1091-100.
 34. Uoa M, Sjoren G, Sundh A, Watari F, Bergman M, Lerner U. Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics. *Dent Mater* 2003; 19(6):487-92.
 35. Shehata M, Durner J, Eldenez A, *et al.* Cytotoxicity and induction of DNA double-strand breaks by components leached from dental composites in primary human gingival fibroblasts. *Dent Mater* 2013 29(9):971-9.
 36. Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. *Journal of Dentistry* 2000; 28(5):341-5.
 37. Manar M. Milhem, Ahmad S. AL-Hiyasa T, Homa D. Toxicity Testing Of Restorative Dental materials Using Brine Shrimp Larvae (*Artemiasalina*). *J Appl Oral Sci* 2008; 16(4):297-301.
 39. Martínez-Hormaza Loanna, *et al.* Determinación de la citotoxicidad de extractos de *Erythroxylumconfusum* Britt. mediante el método de la *Artemia salina*. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 2006; 25(3): 429-31.
 40. Martínez M, *et al.* Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de *bauhiniavariegata* L. (fabaceae). *Rev Cubana Plantmed* 2011; 16(4):313-23.
 41. Pino Perez, Oriel, Jorge Lazo, Fanny. Ensayo de *Artemia*: Util herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Protección Veg.* 2010; 25(1):34-43.
 42. Sorgeloos P, Remiche-Van Der Wielen Claire, Persoone G. The Use of *Artemia Nauplii* for Toxicity Tests- A Critical Analysis. *Ecotoxand Environ safe* 1978; 2 (3,4):249-55.
 43. De Albuquerque Sarmento P, Da Rocha Ataíde T, De Souza A, *et al.* Evaluación del extracto de la *Zeyheria tuberculosa* en la perspectiva de un producto para cicatrización de heridas. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* 2014; 22(1):165-72.
 44. Sánchez L, Neira A. Bioensayo general de letalidad en *artemia salina*, a las fracciones del extracto etanolico de *Psidiumguajava* L y *Psidiumguineense* Sw. *Cultura Cientifica* 2005.
 45. Ribeiro DA, Duarte AHD, Matsumoto MA, Marques MEA, SalvadoriDMF. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *Journal of Endodontics* 2005; 31(8):605-7.
 46. Moharamzadeh K., Ian M., Van Noort B. Van Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials* 2009; 2:514-548.
 47. Martínez M, Ocampo D, Galvis J, Valencia A. Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de *Bauhiniavariegata* L. (Fabaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2011; 16(4):313-23.
 48. González R. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Rev Cubana Estomatol* 2002; 39(2):139-56.
 49. Maldonado MA, Barrera RA, Guzmán RM, Pantoja V. Eugenol: material de uso dental con riesgo de toxicidad local y sistémica. *Rev. Oral* 2008; 9(28):446-449.
 50. Ríos M, Cepero J, KraeL R, Davidenko N, González A. Estudio in vitro de la actividad citotóxica de resinas dentales tipo BIS-GMA. *Biomecánica* 2003; 11:3-9.
 51. Moharamzadeh K. Brook I. Van Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials* 2009; 2:514-48.
 52. Kedjarune U. Charoenworoluk N. Koontongkaew S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: Cytotoxicity testing related to residual monomer. *Australian Dental Journal* 1999; 44(1):25-30.

Citar este artículo de la siguiente forma de acuerdo a las Normas Vancouver:

Rios V, Romero N, Valencia C, Balanta J. Métodos para determinar la biocompatibilidad en materiales dentales. *Rev. estomatol.* 2014; 22(2):7-12.